

537,607

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/057339 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**, 33/573 (74) **Anwalt: VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstr. 4, 81675 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014678 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2003 (19.12.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 60 265.4 20. Dezember 2002 (20.12.2002) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH** [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): STÜRZL, Michael** [DE/DE]; Alterlangerstr. 17b, 91056 Erlangen (DE). **LUBESEDER-MARTELLATO, Clara** [IT/DE]; Rümannstr. 41, 80804 München (DE). **GUENZI, Eric** [FR/DE]; Hermine Bössenecker Weg 24, 85221 Dachau (DE). **KREMMER, Elisabeth** [DE/DE]; Untere Hauptstrasse 28, 85354 Freising (DE).
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** ELISA METHOD FOR THE DETECTION OF GUANYLATE BINDING PROTEIN 1 (GBP-1)

(54) **Bezeichnung:** ELISA-VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON GUANYLAT-BINDUNGSPROTEIN-1 (GBP-1)

(57) **Abstract:** A method is disclosed for the identification and/or quantification of GBP-1 or of fragments of said protein in the culture residue of a tissue sample, a body fluid sample or a sample from a cell culture residue.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes.

WO 2004/057339 A1

ELISA-VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON GUANYLAT-BINDUNGSPROTEIN-1 (GBP-1)

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes.
- 10 Verschiedene Dokumente werden im Text dieser Beschreibung zitiert. Der Offenbarungsgehalt der zitierten Dokument (einschließlich aller Herstellerbeschreibungen, -angaben etc.) ist hiermit per Referenz Teil dieser Beschreibung.

15 Das Endothel ist ein Schlüsselorgan bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Zell-gesteuerter Immunantwort, Menstruation, Wundheilung, Entzündung, Allergie, Herz-Kreislaufferkrankung und Tumorwachstum. Die Pathofunktion des Endothels ist untrennbar mit der Aktivierung von Endothelzellen verbunden.

- 20 Die Aktivierung des Endothels ist ein komplexer Vorgang, der durch eine Vielzahl verschiedener löslicher Faktoren gesteuert wird, die im Blut zirkulieren oder von benachbarten Zellen freigesetzt werden (Fig. 1A). In Folge dieses Prozesses werden die Physiologie und Morphologie der Endothelzellen an die jeweiligen Erfordernisse im Gewebe angepasst. Im Vordergrund stehen hierbei die Steuerung
- 25 der Zellproliferation, Apoptose, Invasion, Migration und Leukozyten-Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen, wodurch die Neu- und Rückbildung von Gefäßen und die Extravasation von Leukozyten reguliert werden (Fig. 1A).

- 30 Die Vielzahl der beteiligten Faktoren legt nahe, dass mehrere Faktoren den selben Phänotyp steuern und zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefaßt werden können (Fig. 1B). Zum Beispiel aktivieren die angiogenen Wachstumsfaktoren *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF)

die Endothelzellproliferation, wohingegen die inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ die Proliferation hemmen und die Leukozyten-Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen erhöhen.

- 5 Derzeit gibt es keine geeigneten Methoden, mit denen bestimmt werden kann, wo und wann die verschiedenen Faktoren in entzündlichen Geweben auf die Endothelzellen wirken. Daher ist über die räumliche und zeitliche Verteilung der verschiedenen Aktivierungszustände von Endothelzellen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen nur sehr wenig bekannt.

10

Die Entwicklung von Entzündungsreaktionen und sich daraus ergebender entzündlicher Erkrankungen ist eine sehr komplexe Abfolge (Kaskade) von unterschiedlichen und synergistischen Wirkungen von inflammatorischen Faktoren wie Zytokinen, die eine Analyse eines definierten Stadiums einer

15 Entzündungsreaktionen und/oder eine verlässliche Voraussage über deren weitere Entwicklung schwer möglich machen. Aufgrund dieser Komplexheit der ablaufenden Reaktionen spricht man in diesem Zusammenhang auch von sogenannten Zytokinnetzwerk.

- 20 Erste Arbeiten, einen molekularen Marker zu identifizieren, der eine Aktivierung von Endothelzellen durch die oben genannten inflammatorischen Zytokine im Gewebe anzeigt, führten zu vergleichenden Untersuchungen zur Genexpression in kultivierten Endothelzellen in Gegenwart unterschiedlicher Aktivierungsbedingungen. Mit diesem Ansatz konnte ein Gen isoliert werden, dessen Expression in
- 25 Endothelzellen selektiv durch inflammatorische Zytokine induziert wird (Fig. 2A) (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al. 2002). Dieses Gen kodiert für das Guanylat-Bindungsprotein-1 (GBP-1), das zur Proteinfamilie der großen GTPasen gehört.

- 30 Um zu bestimmen, ob GBP-1 wie in kultivierten Zellen auch bei Gefäßendothelzellen in humanen Geweben eine Aktivierung durch inflammatorische Zytokine anzeigt, wurden immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von GBP-1 mittels spezifischer monoklonaler Antikörper durchgeführt. Dazu wurden

histologische Schnitte gesunder Haut und von Hauterkrankungen mit einer entzündlichen Komponente, wie zum Beispiel Psoriasis, Arzneimittelgegenreaktion und Kaposi-Sarkom untersucht (Fig. 2B). Allen genannten Hauterkrankungen ist gemeinsam, dass in den Läsionen fokal konzentriert zahlreiche Entzündungszellen vorliegen, die dieselben inflammatorischen Zytokine freisetzen, die auch zu einer erhöhten GBP-1-Expression führen. In den Gefäßen der gesunden Haut konnte GBP-1 in keinem Fall nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren in allen untersuchten entzündlichen Erkrankungen einzelne Gefäße deutlich positiv für GBP-1 (Fig. 2B, Pfeile). Diese Ergebnisse zeigten, dass GBP-1 tatsächlich auch in humanen Geweben eine inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen anzeigt und als molekularer Marker für den Nachweis dieser Aktivierung in Geweben eingesetzt werden kann (Lubeseder-Martellato et al. 2002, Guenzi et al. 2001). Diese Nutzung als molekularer Marker war jedoch auf feste Gewebeproben beschränkt, da die beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass das Protein GBP-1 ein in der Zelle wirkendes Protein ist, das im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. Entsprechend umfassten entsprechende Nachweise die z.B. die Gewinnung von festen Gewebeproben von Patienten. Eine Entnahme von festen Gewebeproben aus entzündlichem Gewebe geht jedoch mit nachteiligen Effekten für die Patienten einher und ist schwierig.

Die Induktion der GBP-1-Expression durch inflammatorische Zytokine geht in Endothelzellen mit einer Hemmung der Zellproliferation einher. Daher wurde untersucht, ob GBP-1 die durch inflammatorische Zytokine induzierte Proliferationshemmung vermittelt. Dazu wurden Endothelzellen mit retroviralen Vektoren transduziert, welche die konstitutive Expression von GBP-1 (GBP-1-Vektor) oder einer *antisense*-GBP-1-RNA (AS-Vektor) bewirken (Abb. 3A). Western blot-Analysen belegten, dass Endothelzellen die mit dem GBP-1-Vektor transduziert wurden, GBP-1 sehr stark exprimierten (Fig. 3B). In Zellen, die mit dem AS-Vektor transduziert wurden, war die Induktion der GBP-1-Expression durch IL-1 β effizient blockiert (Fig. 3B). Nachfolgende Proliferationsexperimente mit den verschiedenen transduzierten Zellkulturen zeigten, dass GBP-1 tatsächlich die durch angiogene Wachstumsfaktoren induzierte Zellproliferation hemmt (Fig. 3C, weiße Balken) und darüber hinaus notwendig ist, dass inflammatorische Zytokine die Proliferation von

Endothelzellen hemmen können (Fig. 3D). Letzteres äußert sich darin, dass in *antisense*-GBP-1-RNA exprimierenden Zellkulturen die Hemmwirkung inflammatorischer Zytokine auf die Zellproliferation deutlich herabgesetzt ist (Fig. 3D, schwarze Balken) (siehe Guenzi et al. 2001).

- 5 Darüber hinaus hemmt GBP-1 die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 und damit einhergehend die Invasion von Endothelzellen (siehe Guenzi et al., 2003).

Weiterführende Untersuchungen zur Struktur-/Funktionsbeziehung von GBP-1 zeigten, dass interessanterweise die Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen für
10 Leukozyten, die ebenfalls durch inflammatorische Zytokine induziert wird, durch GBP-1 nicht beeinflusst wird (Guenzi et al. 2001). GBP-1 ist somit ein neuer, molekularer Marker für eine entzündliche Gefäßaktivierung, der selektiv die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen steuert.

- 15 Bislang konnte gezeigt werden, dass GBP-1 selektiv durch inflammatorische Zytokine induziert wird und dass dieser Prozeß mit einer anti-angiogenen Wirkung auf die betreffenden Zellen korreliert (Lubeseder-Martellato et al., 2002 und Guenzi et al., 2001). Während man sich die Induktion von GBP-1 über dessen anti-proliferative Wirkung im Prinzip für medizinische Zwecke im Rahmen einer anti-
20 angiogenen Therapie zu Nutze machen könnte, ist der Einsatz inflammatorischer Zytokine für derartige Zwecke aufgrund der pleiotropen und damit auch nachteiligen Effekte dieser Zytokine indiskutabel.

Obwohl ein Bedarf an geeigneten molekularen Markern für inflammatorische
25 Erkrankungen besteht, sind eine Vielzahl von Zytokinen und Faktoren, die an der Entstehung und Entwicklung von inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sind, im Stand der Technik aufgrund Ihrer Instabilität als für diesen Zweck ungeeignet beschrieben. Darüber hinaus ist eine Quantifizierung einzelner inflammatorischer Zytokine oder Faktoren nicht ausreichend für einen eindeutigen Befund und
30 erfordert deshalb die Bestimmung einer Vielzahl unterschiedlicher Zytokine und Faktoren, die nur in einem sogenannten „Zytokinnetzwerk“ ihre jeweilige Wirkung zeigen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit Verfahren bereitzustellen, welches eine einfache und gezielte Analyse der Expression von GBP-1 ermöglicht. Diese Verfahren sollte Aussagen über das Stadiums und Fortschreiten einer Entzündungsreaktion in einem Individuum oder in einem in vitro Modell ermöglicht
5 ohne dass eine aufwendige Analyse und Quantifizierung von vielen verschiedenen inflammatorischen Faktoren des sogenannten Zytokinnetzwerks notwendig ist.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

10

Folglich betrifft die vorliegende Erfindung ein in vitro Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
15

- (a) In Kontakt bringen der Probe mit einem ersten Rezeptor, der GBP-1 oder ein Fragmente dieses Proteins spezifisch bindet; und
- (b) Nachweis einer spezifischen Bindung des Rezeptors mit GBP-1 oder einem Fragmente dieses Proteins.

20 Der Begriff Fragment von GBP-1 beschreibt im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung vorzugsweise sowohl Fragmente des Proteins, welche die biologische Aktivität von GBP-1 besitzen wie im Stand der Technik wie auch in dieser Anmeldung beschrieben, als auch Fragmente des Proteins, die durch Spaltung, z.B. enzymatische Spaltung, entstehen und indikativ für inflammatorische
25 Erkrankungen sind.

Der Begriff Körperflüssigkeiten umfasst im Zusammenhang mit der Erfindung alle Arten von Körperflüssigkeiten, ggf. verdünnt oder aufkonzentriert. Beispiele sind Blut/Serum, Plasma, Fruchtwasser, Hirn-Rückenmarkflüssigkeit, Liquor, Zerebrospinalflüssigkeit, Sputum, Rachen und Schlund-Sekrete und andere Schleimhautsekrete, Synovialflüssigkeit, Ascites, Tränenflüssigkeit, Lymphflüssigkeit und Urin.
30

Der Begriff der „spezifische Bindung“ beschreibt erfindungsgemäß eine spezifische Interaktion oder Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor und einem Liganden.

Ein Beispiel für einen solchen Liganden ist GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins. Die spezifische Interaktion oder Wechselwirkung kann mit einem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ charakterisiert werden. Der Rezeptor und der Ligand besitzen Strukturen oder Motive, die spezifisch zueinander passen, wie z.B. eine antigene Determinante (Epitop), die mit der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers wechselwirkt. Entsprechend steht spezifische Interaktion im Gegensatz zu einer universelleren, unspezifischen Wechselwirkung.

Es wurde gezeigt, dass GBP-1 ein Markerprotein für Entzündungsreaktionen ist, dass überraschenderweise u.a. von endothelialen Zellen und Monozyten sezerniert wird. Durch diesen überraschenden Befund wird es möglich GBP-1 im Kulturüberstand von Gewebeproben, Proben von Körperflüssigkeit oder Proben von Zellkulturüberständen zu analysieren und eine Aussage über das Stadium einer entzündlichen Erkrankung zu treffen. Sezerniertes GBP-1 kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einfach und schnell nachgewiesen werden und dient somit als krankheitsassoziiertes diagnostischer Parameter.

Der Nachweis einer entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten in der Körperflüssigkeit von Patienten mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist auf Grundlage des überraschenden Befundes von besonderer Bedeutung bei Entzündungserkrankungen, bakteriellen und viralen Infektionserkrankungen (AIDS, Meningitis), Allergien, Transplantationsreaktionen, Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen usw. Darüber hinaus sind diese von Bedeutung für die Bestimmung der Ansprechreaktion bei Patienten unter der Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interferon- α); siehe Figur 5.

Der Nachweis, bzw. die quantifizierte Menge von GBP-1 in einer Probe einer Körperflüssigkeit eines Patienten ermöglicht Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad von Endothelzellen und Monozyten und damit eine Aussage über das Krankheitsbild des Patienten.

Verfahren zur Gewinnung von den genannten Proben sind dem Fachmann bekannt. Optional umfasst das erfindungsgemäße Verfahren darüber hinaus einen oder mehrere Waschschrte vor oder nach jedem Verfahrensschritt. Diese Waschschrte dienen der Minimierung von unspezifischen Reaktionen (falsch positiver oder falsch negativer Nachweis) und können die Sensitivität des Verfahrens verbessern.

Geeignete Wachpuffer und deren Zusammensetzung sind dem Fachmann im Prinzip bekannt; siehe z.B. Harlow und Lane. Bevorzugt sind physiologische Pufferlösungen.

- 5 Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst darüber hinaus den Schritt (a') oder (a'') vor dem in Kontakt bringen mit dem ersten Rezeptor:
- (a') Markieren der in der Probe enthaltenen Proteine; oder
- (a'') Markieren des ersten Rezeptors.
- 10 Die in der Probe enthaltenen Proteine und/oder der erste Rezeptor können beispielsweise chemisch markiert werden, z.B. durch die Kopplung von markierten chemischen Gruppen oder Markern an die freien Aminogruppen von in den Proteinen enthaltenen Cysteine. Beispiele für solche markierte chemische Gruppen sind Gruppen, die spezielle, nachweisbare Radioisotope enthalten. Als Marker
- 15 können z.B. auch Fluoreszenzfarbstoffe dienen. Ein weiteres Beispiel für entsprechende Marker stellen Nukleinsäuren dar. Die Anwesenheit von auf diese Weise markierten Proteinen oder Rezeptoren in einer Probe kann dann mit geeigneten Primern in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.
- 20 Des weiteren ist es möglich Proteine physiologisch zu markieren, d.h. durch den metabolischen Einbau von markierten Molekülen. Zu diesem Zweck werden Zellen beispielsweise mit radioaktiv markierten Metaboliten inkubiert. Proteine, die während dieser Inkubationszeit aus der Biosynthese dieser Zellen hervorgehen und in welche die markierten Metaboliten eingebaut wurden, sind markiert. Dieses
- 25 Verfahren ist z.B. geeignet, um von antikörperproduzierenden Zellen sezernierte Antikörper zu markieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Rezeptor vor dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert.

30

Entsprechend einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Rezeptor nach dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert.

Rezeptoren können auf vielfältige Weise immobilisiert werden. Das entsprechende Verfahren hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. von der Art des Rezeptors oder dem Material der Oberfläche. Eine Immobilisierung kann kovalent oder durch Adsorption erfolgen. Entsprechend einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Rezeptoren Proteine, besonders bevorzugt Antikörper. Ebenso bevorzugt ist auch die Verwendung von Peptiden oder organischen Molekülen als Rezeptoren.

Für die Immobilisierung von Rezeptoren, die Proteine sind, werden Verfahren beschrieben, bei welchen diese direkt auf einer Oberfläche mittels passiver Adsorption immobilisiert werden. Üblicherweise besteht eine entsprechende Oberfläche aus einem polymeren Kunststoff (z.B. Polystyrol, Polyvinyl, Latex) und z.B. in Form von Mikrotiterplatten oder Multi-well-Platten, Membranen oder sphärischen 'Beads' (quervernetzten Polymeren in Partikelform) für diesen Zweck verwendet (Lowman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997), 401-24).

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Material der Oberfläche ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Sepharose, Latex, Glass, Polystyrol, Polyvinyl, Nitrocellulose und Silicium.

Weiter bevorzugt ist die Oberfläche in dem erfindungsgemäßen Verfahrens eine Membran, ein Kügelchen, ein Chip oder eine Platte.

Beispiele für Kügelchen sind Sepharose-beads oder Latex-beads, an die optional Liganden gebunden sind, die eine Immobilisierung der Rezeptoren an die Oberfläche begünstigen. Solche Liganden sind beispielsweise Protein-A oder Protein-G, die eine Bindung von Antikörper an eine Oberfläche über den Fc-Teil der Antikörper begünstigen. Die Bindung des Rezeptors an Trägermaterial kann auch durch eine kovalente chemische Kopplungsreaktion (z.B. Hydrazid-Kopplung) erreicht werden. Beispiel 3 beschreibt ein entsprechendes Verfahren. Ein anderes Beispiel für die Immobilisierung der Rezeptoren an die Oberfläche unter Verwendung von Liganden ist die Verwendung von Biotin und Avidin, bzw. Streptavidin.

Beispiele für Chips sind Siliziumplatten, auf die eine Vielzahl von verschiedenen oder gleichen Rezeptoren geordnet immobilisiert werden kann. Dies ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von unterschiedlichen Parametern in einer Probe oder die

Analyse einer Vielzahl von unterschiedlichen Proben auf einen oder mehrere Parameter hin, z.B. Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins in unterschiedlichen Gewebeproben, Proben von Körperflüssigkeit oder Proben von Zellkulturüberständen.

5 Beispiele für die genannten Platten sind Mikrotiterplatten oder Multi-well-Platten. Diese besitzen vorzugsweise 6, 12, 24, 48, 96, 128, 356, 1024 oder mehr Vertiefungen. In Beispiel 4 ist ein Verfahren beschrieben, in dem 96well-Platten verwendet werden.

10 Entsprechend einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst dieses darüber hinaus den Schritt (a''') vor dem Schritt des Nachweises einer spezifischen Bindung:

(a''') präzipitieren der Kügelchen mit den daran gebundenen Komplexen aus erstem Rezeptor und GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins

15 Kügelchen können aus einer Probe z.B. gravimetrisch präzipitiert werden. Dies kann beispielsweise durch Zentrifugation beschleunigt werden. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann u.a. aus Rehm, Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag, 2002 bekannt. Des weiteren wird eine entsprechende Präzipitation in Beispiel 3 beschrieben.

20

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst der Nachweis der spezifischen Bindung in Schritt (b) eine gelelektrophoretische Auftrennung, optional darüber hinaus eine Western-Blot-Analyse (siehe Beispiel 3). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann u.a. aus

25 Rehm, loc. cit. bekannt.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins an den ersten Rezeptor in Schritt (a) die Probe mit einem zweiten

30 Rezeptor für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins in Kontakt gebracht, der an ein Epitop von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins bindet, das nach Bindung des ersten Rezeptors an GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins zugänglich ist.

Diese bevorzugt Ausführungsform betrifft beispielsweise Verfahren, die sich das mechanistische Prinzip des Sandwich-ELISA's zu Nutze machen. Dieses Prinzip ist dem Fachmann allgemein bekannt und wird u.a. in Stryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, 1996 beschrieben. Ein entsprechendes Verfahren ist darüber hinaus im beigefügten Beispiel 4 beschrieben.

Weiter ist der zweite Rezeptor für GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens markiert. Verfahren, die eine Markierung eines Rezeptors ermöglichen, wurden oben beschrieben und können auch hier eingesetzt werden.

Darüber hinaus ist bevorzugt, dass die Markierung des zweiten Rezeptors für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins ein signalgebendes System umfasst. Ebenso bevorzugt ist eine spezifische Erkennung der Markierung durch einen weiteren, dritten Rezeptor, der ein signalgebendes System umfasst.

Ein Beispiele für ein solches signalgebendes System ist die oben beschriebene Isotopenmarkierung, wobei das Signal die Abgabe von radioaktiver Strahlung ist. Ebenso resultiert eine Fluoreszenzmarkierung des entsprechenden Rezeptors in der Markierung mit einem signalgebenden System im Sinne der Erfindung, wobei das Signal die Emission eines Fluoreszenzsignals nach entsprechender Anregung des Farbstoffes ist.

Weiter bevorzugt umfasst das signalgebende System erfindungsgemäß ein Enzym, das ein Signal abgibt. Beispiele für solche Enzyme umfassen alkalische Phosphatasen, Peroxidasen, β -Galaktosidase, Glukoamylase, Urease und Chloramphenikol-Azetyltransferase. Entsprechende Beispiele und der Einsatz notwendiger Substrate für den Nachweis mit Hilfe von enzymatischen Reaktionen sind dem Fachmann bekannt, u.a. aus den Beipackzetteln kommerzielle erhältlichen Nachweiskits oder aus Rehm, loc. cit. Solche kommerzielle erhältlichen Nachweiskits enthalten oft Antikörper, die Antikörper bestimmter Spezies erkennen, z.B. anti-Maus, und an die signalgebende Enzyme gekoppelt sind. Somit stellen entsprechende Antikörper ein Beispiel für einen dritten Rezeptor dar, die eine bestimmte Markierung des zweiten Rezeptors, nämlich dessen Fc-Teil erkennen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der erste und der zweite Rezeptor und, optional, auch der dritte Rezeptor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Polypeptiden, niedermolekularen Substanzen, Antikörpern oder Fragmenten oder Derivaten davon und Aptameren.

Der Begriff Peptide bezeichnet üblicherweise Aminosäureketten mit bis zu 30 Aminosäuren. Der Begriff Polypeptide bezeichnet Peptide, die üblicherweise mehr als Aminosäureketten 30 Aminosäuren umfassen und schließt Proteine ein.

Unter dem Begriff "niedermolekulare Substanzen" oder kleine Moleküle werden Moleküle verstanden, die von geringerer molekularer Komplexität sind, als die oben definierten Makromoleküle. In der Literatur wird der Begriff "niedermolekulare Substanzen" nicht einheitlich verwendet. In WO 89/03041 und WO 89/03042 werden Moleküle mit Molekülmassen bis 7000 g/mol als kleine Moleküle beschrieben. Üblicherweise werden jedoch Molekülmassen zwischen 50 und 3000 g/mol, häufiger aber zwischen 75 und 2000 g/mol und meistens im Bereich zwischen 100 und 1000 g/mol angegeben. Beispiele sind dem Fachmann aus den Schriften WO86/02736, WO97/31269, US-A-5928868, US-A-5242902, US-A-5468651, US-A-5547853, US-A-5616562, US-A-5641690, US-A-4956303 und US-A-5928643 bekannt. Niedermolekulare Substanzen können organischer oder anorganischer Natur sein.

Der Begriff „Antikörper“ umfasst erfindungsgemäß polyklonale Sera, wie auch monoklonale Antikörper.

Monoklonale Antikörper und Verfahren zu deren Herstellung sind dem Fachmann bekannt. Diese basieren auf einer zuerst von Köhler und Milstein (1975) beschriebenen Methode. Diese ist u.a. in dem Laborhandbuch von Harlow und Lane (Antibodies, A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory; (1988); Chapter 6) detailliert beschrieben. Durch die Definition umfaßt sind ebenfalls bispezifische Antikörper, synthetische Antikörper und Fragmente oder Derivate dieser Antikörper. Diese umfassen Fragmente wie Fab, Fv oder scFv und chemisch modifizierte Derivate dieser Antikörper oder Antikörperfragmente.

Aptamere sind dem Fachmann im Prinzip aus dem Stand der Technik bekannt.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Verfahren ein ELISA, EIA, oder RIA.

Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt aus Harlow und Lane, loc. cit. und Rehm, loc. cit.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise automatisiert ausgeführt. Dies ist u.a. möglich durch die Verwendung von Pipetierrobotern und für eine automatisierte Auswertung optimierter Arbeitsgänge.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes, wie vorstehend definiert, zum Nachweis von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins, wobei der positive Nachweis indikativ ist für das Vorhandensein einer inflammatorischen Erkrankung.

Die weiteren (bevorzugten) Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendung entsprechen den für das oben beschriebene Verfahren.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Komplexität und Redundanz entzündlicher Endothelzellaktivierung.

(A) Die Aktivierung des Endothels bei entzündlichen Prozessen wird durch eine Vielzahl verschiedener löslicher Faktoren aus dem Blut und von benachbarten Zellen gesteuert. Dabei stehen im Rahmen der Neu- und Rückbildung von Gefäßen, sowie der Extravasation von Leukozyten die Steuerung von Zellproliferation, Apoptose, Invasion, Migration und Adhäsionsfähigkeit für Leukozyten im Vordergrund.

(B) Die Vielzahl der beteiligten Faktoren legt nahe, dass mehrere Faktoren ein- und dieselbe Aktivierung beeinflussen und zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefasst werden können. Gegenwärtig kann nicht bestimmt werden, wann und wo die verschiedenen Faktoren auf die einzelnen Endothelzellen einwirken. Darüber hinaus sind die Beziehungen der meisten Aktivierungsarten zueinander weitgehend unbekannt. Es ist zu bestimmen, ob alle Aktivierungen gleichzeitig in einer Zelle auftreten können (I) oder aufgrund zellbiologischer Restriktionen zeitlich, beziehungsweise räumlich separiert sein müssen (II).

Fig. 2: Expression von GBP-1 in kultivierten Endothelzellen und in entzündlichen Erkrankungen der Haut.

- (A) Western Blot-Analyse der GBP-1 Expression in Endothelzellen, die mit den aufgeführten Faktoren für 24 h stimuliert worden waren. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: IFN- γ (100 U/ml), IL-1 α (5 ng/ml), IL-1 β (200 U/ml), TNF- α (300 U/ml), IL-4 (10 U/ml), IL-6 (50 U/ml), IL-10 (50 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), Oncostatin M (10 ng/ml), MCP-1 (50 ng/ml), PF4 (25 ng/ml), SDF-1 α (200 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), VEGF (10 ng/ml), Ang-2 (800 ng/ml) und PDGF B/B (100 ng/ml). Der gleichzeitige Nachweis des Zytoskelettproteins Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.
- (B) Induktion der GBP-1-Expression in vaskulären Endothelzellen bei Hauterkrankungen mit einer inflammatorischen Komponente. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von GBP-1 (grün) und dem Endothelzell-assoziierten Antigen CD31 (rot) in Gewebeschnitten von gesunder Haut, Kaposi-Sarkom, entzündlicher Arzneimittelgegenreaktion der Haut und Psoriasis. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine Ko-Expression (gelb) von GBP-1 und CD31 (weiße Pfeile). (Modifiziert nach (Lubeseder-Martellato, Guenzi et al. 2002))

Fig. 3: GBP-1 vermittelt die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine in Endothelzellen.

- (A) Schematische Darstellung des retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (Kontrollvektor, K-Vektor) in den die cDNA von GBP-1 in beiden Orientierungen für die konstitutive Expression von GBP-1 (GBP-1-Vektor) und für die Expression einer GBP-1-*antisense*-RNA (AS-Vektor) eingesetzt wurde.
- (B) GBP-1-Expression in K-, GBP-1-, und AS-Vektor transduzierten Endothelzellen, die entweder unbehandelt waren oder über einen Zeitraum von 24 h mit 20 U/ml IL-1 β stimuliert wurden. Der Nachweis der GBP-1-Expression erfolgte mittels Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-GBP-1-Antikörper. Die gleichzeitige Färbung mit Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.
- (C) Proliferationsexperimente mit K-Vektor- und GBP-1-Vektor-transduzierten Endothelzellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen angiogener Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF in Kombination).

(D) Proliferationsexperimente von K-Vektor- und AS-Vektor-transduzierten Endothelzellen in Anwesenheit angiogener Wachstumsfaktoren und aufsteigender Konzentrationen von IL-1 β . (Modifiziert nach (Guenzi, Topolt et al. 2001))

5 **Fig. 4: Nachweis von GBP-1 Protein in Kulturmedium von IFN- γ stimulierten HUVEC durch ELISA und Immunopräzipitation**

HUVEC wurden Stimuliert mit 100 U/ml IFN- γ (IFN- γ) oder unbehandelt gelassen (Medium). Nach 24 h Kultur wurde das Kulturmedium durch ELISA (A) oder Immunopräzipitation (B) analysiert.

10 (A) Eine Verdünnungsserie mit rekombiantem aufgereinigtem GBP-1 wurde als Standard verwendet (weiße Säulen). Die Menge von sekretiertem GBP-1 Protein wurde im ELISA bestimmt (graue Säulen). Die Absorption wurde bei 405 nm bestimmt.

(B) Westernblot-Analyse von immunopräzipitierten menschlichem GBP-1 Protein
15 mit monoklonalem anti GBP-1 Antikörper (Klon 1B1) aus dem selben Kulturüberstand wie in (A).

Fig. 5: Messung von zirkulierendem GBP-1 im Plasma von IFN- α behandelten Patienten

20 Bei Melanom-Patienten, die für 9 bzw. 28 Tage mit IFN- α behandelt wurden, wurde die Konzentration von zirkulierendem GBP-1 im Plasma mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Anstieg der GBP-1 Konzentration von Tag 9 zum Tag 28 bei drei Patienten. ELISA-Mikrotiterplatten wurden mit einem monoklonalen Ratten anti-GBP-1 Antikörper, Klon 1B1, für 16 h bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden die
25 Platten mit PBS-T (0,1 % Tween 20 in PBS) und für 30 min wurden bei Raumtemperatur (RT) freie Bindungsstellen mit PBS-T/BSA 2 % (PBS-TB) abgesättigt. Nach dem absaugen des PBS-TB erfolgte Inkubation (2 h) mit je 100 μ l verschiedener Plasma Proben (1:2) bei RT. Als Standard wurde gereinigtes GBP-1-His Protein, verdünnt in Zellkulturmedium (EMB-0,5% FCS) benutzt. Als
30 Negativkontrolle diente BSA. Die Proben wurden 4x mit PBS-T gewaschen, je 100 μ l polyklonaler Kaninchen anti-GBP-1 Antikörper (1:500) zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligen Waschen mit PBS-T erfolgte eine Inkubation (1 h, RT) mit je 100 μ l AP-konjugiertem anti-Kaninchen Antikörper (1:500 verdünnt in

PBS-TB). Nach vier weiteren Waschschritten wurde der GBP-1 Protein/Antikörper-Komplex durch Inkubation mit 100 μ l p-Nitrophenyl Phosphat visualisiert. Die Absorption wurde bei 405 nm im Mikroplatten-Reader gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standardkurve für die steigende Konzentrationen von gereinigtem GBP-1-His verwendet wurden. Sie Linearität der Messung ist für einen Bereich von 0,1 bis 100 ng/ml gegeben.

Fig. 6: Die Sekretion von GBP-1 Protein aus IFN- γ behandelt HUVEC ist nicht zunehmende Zellmembranpermeabilität oder Apoptose zurückzuführen

Färbung von HUVEC mit dem nicht membrangängigen Farbstoff „Dead-Red“ (Molekular Probes).

HUVEC wurden über Nacht in 0,5 % FBS-haltigen EBM-Medium kultiviert und mit 100 U/ml Interferon- γ (IFN- γ , Roche) stimuliert. Kontrollzellen (Medium) wurden unbehandelt belassen. 24 h nach der Stimulierung wurden die Zellen mit *Dead-Red* Farbstoff angefärbt. Zellen, die eine veränderte Membranpermeabilität aufweisen (schwarze Balken), sind als Prozentsatz der Gesamtzahl (weiße Balken) angegeben.

Fig. 7. Der ELISA reagiert spezifisch mit GBP-1 und nicht mit den heterologen Proteinen BSA und eGFP

(A) Die Spezifität des GBP-1-ELISA wurde in mehreren Kontrollexperimenten bestimmt. Zunächst wurde mit dem ELISA eine Verdünnungsreihe von gereinigtem GBP-1-His (ein GBP-1-Protein, das aus Bakterien gereinigt wurde und zum Zwecke der Aufreinigung mit 6 Histidinresten am Carboxyterminus versehen ist) in PBS in den angegebenen Konzentrationen erzeugt und im ELISA gemessen. Hierbei wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Absorption bei 405 nm (A_{405}) beobachtet (schwarze Balken). Wenn anstelle des anti-GBP-1-Kaninchenserums (wird als zweiter Antikörper zum Nachweis des gebundenen GBP-1 eingesetzt) ein Präimmunserum des Kaninchens verwendet wurde, wurden keine Signale erhalten (weiße Balken). Beim Zusatz aufsteigender Konzentrationen heterologer Proteine [BSA (graue Balken), His-eGFP (gestreifte Balken)] wurden mit dem GBP-1-spezifischen ELISA ebenfalls keine Signale beobachtet.

(B) Der GBP-1-ELISA zeigt eine geringe Reaktivität mit dem GBP-1-homologen GBP-2.

Mit dem GBP-1-ELISA wurden Lösungen untersucht, die aufsteigende Mengen an GBP-1-His (schwarze Balken), His-GBP-1 (weiße Balken, ein GBP-1-Protein, das aus Bakterien gereinigt wurde und zum Zwecke der Aufreinigung mit 6 Histidinresten am Aminotermius versehen ist) und His-GBP-2 [graue Balken, einem zu GBP-1 homologen Protein (Homologie auf Aminosäureebene 76 %, auf Nukleinsäureebene 82 %) mit 6 Histidinresten am Aminotermius] enthielten. Der Vergleich der Steigungen der Messwerte für GBP-1-His (schwarze Balken), His-GBP-1 (weiße Balken) und His-GBP-2 (graue Balken) zeigte, dass die Reaktivität dieses ELISA mit GBP-2 im Vergleich zur Reaktivität mit GBP-1 verringert ist und dass die Histidinreste am Amino- oder Carboxyterminus die Reaktivität von rekombinantem GBP-1 nicht beeinflussen.

Zusätzlich wurden immunchemische Blockierungsversuche durchgeführt, um die Spezifität der Bindung von gereinigtem GBP-1-His und die mit Ratten-anti-GBP-1-Antikörpern beschichtete ELISA-Platte zu bestimmen. Hierzu wurde GBP-1-His in verschiedenen Verdünnungen mit (schwarz-weiße Balken) oder ohne (schwarze Balken) Ratten-anti-GBP-1-Antikörper inkubiert und nachfolgend auf die Platte gegeben. In den Ansätzen, in denen GBP-1-His nicht mit Antikörpern vorinkubiert wurde, wurde eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Signalstärke beobachtet (schwarze Balken). Wohingegen, durch Vorinkubation mit anti-GBP-1-Antikörpern (schwarz-weiße Balken) die Bindung von GBP-1 an die Plattenoberfläche blockiert werden konnte. In einem vergleichbar durchgeführten Ansatz konnte auch die Bindung von His-GBP-2 durch Vorinkubation mit dem Ratten-anti-GBP-1-Antikörper blockiert werden (grau-weiße Balken).

Fig. 8: Bestimmung des linearen Nachweisbereichs des ELISA

(A) Gepoolte Seren gesunder Personen wurden 1:2 (Quadrate), 1:4 (Kreise), 1:8 (Dreiecke) und 1:16 (Rauten) in PBS/2% BSA verdünnt. In die unterschiedlichen Verdünnungen wurden jeweils aufsteigende Konzentrationen von GBP-1-His zugegeben. Nachfolgend wurden alle Proben mit dem GBP-1-ELISA vermessen. Es zeigte sich, dass bei jeder der unterschiedlichen Serumverdünnungen die Nachweissignale (A405) mit der GBP-1-Konzentration zunahmen.

(B) Zwischen 0 und 200 ng/ml wurde bei den in (A) beschriebenen Ansatz eine lineare Zunahme des Signals beobachtet.

Fig.9: Bei Patienten mit Entzündungserkrankungen sind erhöhte GBP-1 Konzentrationen im Serum nachweisbar

Die GBP-1 Konzentration wurde mittels ELISA in gesunden Kontrollpersonen (n = 20) und in Seren von Patienten mit verschiedenen Entzündungserkrankungen (n = 10) gemessen: Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) (n = 5) und Arthritis (n = 5), diese Erkrankungen sind generalisierte Entzündungen, und in Patienten mit Erysipel (n=8), eine örtlich begrenzte Entzündung der Haut.

Die GBP-1 Serumkonzentrationen wurden bestimmt, wobei die Serum-Proben 1:2 verdünnt wurden. Die Konzentration von GBP-1 in den Proben wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Da das ELISA-Verfahren auch GBP-2 erkennt und möglicherweise auch GBP-2 im Serum vorhanden ist, wurden die ermittelte Konzentrationen in relativen Einheiten angegeben.

Die GBP-1 Serumkonzentrationen waren deutlich erhöht bei den Patienten mit SLE (Median: 46,1 relative Einheiten) und Arthritis (Median: 58,2 relative Einheiten) aber nicht in Patienten mit Erysipel (Median: 8,6 relative Einheiten) im Vergleich zu den Kontrollpersonen (Median: 13,3 relative Einheiten). Die Unterschiede der GBP-1 Konzentrationen bei Patienten mit SLE und Arthritis und der GBP-1 Konzentration in gesunden Kontrollpersonen sind statistisch signifikant (Wilcoxon-Test $p < 0,01$ für SLE und Arthritis).

Fig.10: Bei Patienten mit bakterieller Meningitis sind erhöhte GBP-1 Konzentrationen im Liquor nachweisbar

In einem Blindversuch wurde mittels ELISA die GBP-1 Konzentration in 17 Liquor-Proben nachgewiesen (Figur 10). Nach Entblindung des Versuches zeigte sich, dass bei Patienten mit bakterieller (Pneumokokkus, Staphylokokkus aureus, Pseudomonas aeruginosa) Meningitis (n = 8) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (n = 9) signifikant erhöhte (Wilcoxon-Test $p < 0,03$) GBP-1 Konzentrationen im Liquoren nachweisbar waren (Kontrollpersonen = 36,6 relative Einheiten und bakterieller Meningitis = 105,8 relative Einheiten). Die GBP-1 Liquorkonzentrationen wurden bestimmt wie beschrieben. Die Liquor-Proben

wurden 1:2 in PBS verdünnt. Die Konzentration von GBP-1 in der Probe wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Da das ELISA-Verfahren auch GBP-2 erkennt und möglicherweise auch GBP-2 im Liquor vorhanden ist, wurden die ermittelte Konzentrationen in relativen Einheiten angegeben.

- 5 Die GBP-1 Konzentration im Liquor gesunden Kontrollpersonen zeigten keinen statisch signifikanten Unterschied (Wilcoxon-Test $p > 0,05$) zu den GBP-1 Konzentrationen im Serum. Dies weist darauf hin, dass GBP-1 nicht im Liquor gesunder Personen angereichert ist und dass der Anstieg der GBP-1 Konzentrationen bei Patienten mit Meningitis krankheitsbedingt ist.

10

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung eines Vektorkonstruktes

15

Das 237 bp GBP-1 Promotorfragment (pro237-GBP-1) wurde mittels PCR-Amplifikation (PCR 2 Advantage Kit, Clontech) von dem Konstrukt pro3757-GBP-1 mit den Oligonukleotiden 5'-ATTGAAGCTTCTGGTTGAG-3' [einfügen einer HindIII-Schnittstelle (unterstrichen)] bzw. 5'-TGGCTTCTAGCACTTCTG-3' generiert.

- 20 Das Konstrukt pro3757-GBP-1 enthält 3757 bp der 5'-regulatorischen Sequenz aufwärts des ATG-Kodons des *GBP-1* Gens (gi:4503938, NM_002053) im Vektor pT-Adv (Clontech). Das 237 bp Fragment wurde in Antisense-Orientierung mit dem Vektor pT-Adv ligiert, mit HindIII geschnitten und in den pGL3-Basic Vektor (Promega) subkloniert. Alle Konstrukte wurden mit dem Endofree Maxi Kit (Qiagen)
- 25 aufgereinigt und zur Verifizierung sequenziert.

Beispiel 2: Etablierung einer geeigneten Zelllinie

- 30 HEK 293 T-Zellen (humane embryonische epitheliale Nierenzelllinie mit humanen Adenovirus Typ 5 (Ad 5) DNA transformiert (ATCC CRL 1573), welche zusätzlich mit SV40 T Antigen transformiert sind) wurden mit 3×10^5 Zellen/Well (6-Multi-Well Platte, Corning) 24 h vor der Transfektion ausgesät. Pro Well der 6-Well Platte wurden gesamt 0,8 μ g Plasmid verwendet, wobei das Testplasmid pro237-GBP-1

im Verhältnis 1:5 mit dem Selektionsplasmid pBABE-Puro (P. Monini, Laboratory of Virology, Instituto Superiore di Santiá, Rome, Italien) eingesetzt wurde. Das Testplasmid pro237-GBP-1 enthält das 237 bp Promotorfragment gekoppelt an das Indikatorgen firefly-Luziferase, das Selektionsplasmid pBABE-Puro das Resistenzgen Puromycin, worauf anschließend selektioniert wird. Die Transfektion der Zellen wurde analog Vorschrift des Herstellers mit Effectene (Qiagen) durchgeführt und nach 24 h die Selektion mit 0,7 µg/ml Puromycin (Sigma) begonnen. Bei Tag 8-10 konnte das Wachstum von Einzelklonen beobachtet werden, die anschließend mit Klonierringen trypsinisiert und in Einzelwells einer 96-well Platte (Falcon) überführt wurden. Bei entsprechender Konfluenz wurden die Klone weiter passagiert und auf ihre Reporter-gen-aktivität im Luziferaseassay untersucht. Die Klone wurden mit inflammatorischen Zytokinen IFN-γ, IL-1β und TNF-α, sowie Buffer für 5 h stimuliert und in 1x „passive lysis buffer“ (Promega) abgeerntet. Die Lysate wurden auf firefly-Luziferase-Aktivität untersucht und entsprechend stabile Klone etabliert.

Beispiel 3: Immunopräzipitation von GBP-1

Frisch hergestellte Zelllysate wurden vorgereinigt durch Inkubation mit 2 µl nicht mit GBP-1 reagierendem Präimmunserum von Kaninchen und 25 µl Protein A/G Agarosebeads für mindestens 3 h bei 4°C auf einer Schüttelplattform. Nach dem Pelletieren der Beads wurde der Überstand mit 25 µl Protein A/G Agarosebeads und 1 µl von polyklonalem Kaninchenserum gegen GBP-1 über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die Beads wurden vier bis fünf mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 30 µl Laemmli-Probenpuffer (2X) resuspendiert und für 5 min gekocht. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und in einem Westernblot oder in einer Autoradiographie analysiert.

Für die Immunopräzipitation von GBP-1 oder MMP-1 aus Zellkulturüberständen wurden 10 ml Kulturmedium auf Eis gestellt, 5 min zentrifugiert bei 1000 rpm, filtriert durch einen Filter mit einer Porengröße von 45 µm und in einigen Fällen ein Proeinaseninhibitor-Cocktail (0,02 mg/ml Pankreasextrakt, 5 µg/ml Pronase, 0,5 µg/ml Thermolysin, 3 µg/ml Chymotrypsin und 0,33 µg/ml Papin) zugegeben. Die Vorreinigung wurde ausgeführt durch Inkubation mit 10 µl Kaninchenserum und 120

μ l Protein A/G Agarosebeads für mehr als 3 h bei 4°C auf einer Schüttelplattform. Nach dem Pelletieren der Beads wurde der Überstand mit 120 μ l Protein A/G Agarosebeads und 6 μ l von polyklonalem Kaninchenserum gegen GBP-1 über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die Beads wurden vier bis fünf mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 60 μ l PBS + 60 μ l Laemmli-Probenpuffer (2X) resuspendiert und für 5 min gekocht. Üblicherweise wurden 15 μ l jeder Probe in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und in einem Westernblot analysiert.

Ein Beispiel für das Ergebnis eines Nachweises von GBP-1 durch Immunopräzipitation aus Kulturmedium ist in Figur 4B dargestellt.

Beispiel 4: GBP-1 ELISA

Für den entwickelten GBP-1 ELISA wurden folgende Puffer verwendet:

PBS enthaltend 0,1% Tween 20 (PBS-T) und PBS enthaltend 0,1% Tween 20 und 2% BSA (PBS-TB).

96-well-ELISA-Platen (Nunc-Immuno Plates) wurden beschichtet mit 100 μ l/well anti-GBP-1 Hybridomaüberstand (im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt) oder mit gereinigtem Rezeptor in der Konzentration von 1-5 μ g/ml (Inkubation für 16 h bei 4°C). Die Platten wurden mit PBS-T gewaschen und geblockt mit PBS-TB für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. Die wells wurden abgesaugt und als Dubletten für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert mit 100 μ l des Standards (GBP-1-His, verdünnt in Zellkulturmedium enthaltend 5% FBS), der gleichen Konzentration von BSA als Kontrolle oder mit 100 μ l einer Probe in geeigneter Verdünnung (verdünnt in PBS). Die wells wurden vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l eines polyklonalen Antikörpers gegen GBP-1, verdünnt in 1:500 in PBS-TB für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die wells vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l einer alkalinen Phosphatase, die an einen anti-Kaninchen Antikörper konjugiert ist (Zymed, Berlin, Germany), verdünnt 1:500 in PBS-TB, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die wells vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l von p-Nitrophenyl Phosphat (Zymed) inkubiert. Die Absorption wurde bei 405 nm in einem „microplate reader“

(BioRad) bestimmt. Die Konzentration von GBP-1 in der Probe wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Das Verfahren zeigte eine Linearität von 0,1 bis 100 ng/ml von GBP-1/well. Die Variabilität der Ergebnisse in unterschiedlichen Assays lag zwischen 2,3 und 6%.

- 5 Ein Beispiel für das Ergebnis eines Nachweises von GBP-1 in Kulturüberstand durch ELISA ist in Figur 4A dargestellt.

Die Sensitivität des ELISAs wurde anhand einer Verdünnungsreihe von GBP-1-His (ein GBP-1-Protein, das aus Bakterien gereinigt wurde und zum Zwecke der
10 Aufreinigung mit 6 Histidinresten am Carboxyterminus versehen ist) in PBS bestimmt.

Die Sensitivität des ELISA wurde festgelegt als die niedrigste Konzentration an GBP-1-His, bei der der zugehörige Messwert sich signifikant, das heißt um mindestens zwei Standardabweichungen, von dem Messwert unterschied, der beim
15 Ansatz ohne GBP-1-His (plus zwei Standardabweichungen) erhalten wurde. Hierbei wurde die Sensitivität des hier beschriebenen ELISA mit 12,3 ng/ml bestimmt.

1. Intra-Assay-Variabilität.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Versuchs wurde durch
20 dreifach Messungen bestimmt. Dabei wurde die Variabilität auf folgende Weise berechnet:

Variabilität = (Standardabweichung / Mittelwert) X 100 %.

25 Es wurden durch Zugabe von GBP-1-His in Serum (1:2 in PBS verdünnt) eines gesunden Probanden drei Testlösungen mit unterschiedlichen GBP-1-His Konzentrationen (400 ng/ml, 180 ng/ml, 40 ng/ml) erzeugt. Mit jeder Lösung wurde die Intra-Assay-Variabilität bestimmt:

GBP-1-His 400 ng/ml; Intra-assay Variabilität = 2,7 %

30 GBP-1-His 180 ng/ml; Intra-assay Variabilität = 2,8 %

GBP-1-His 40 ng/ml; Intra-assay Variabilität = 2,0 %

2. Inter-Assay-Variabilität:

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität wurde die Reproduzierbarkeit des ELISA in verschiedenen Versuchen bestimmt. Hierzu wurde jede der oben beschriebenen Lösungen sechsmal gemessen. Die inter-Assay-Variabilität wurde wie oben beschrieben berechnet.

- 5 GBP-1-His 400 ng/ml; Inter-assay Variabilität = 4,4 %
GBP-1-His 180 ng/ml; Inter-assay Variabilität = 2,8%
GBP-1-His 40 ng/ml; Inter-assay Variabilität = 3,0%

Literature

- 10 Carmeliet. and Jain: Nature 407(6801): 249-57 (2000).
Folkman: Nat Med 1(1): 27-31 (1995).
Guenzi, Töpol, Cornali, Lubeseder-Martellato, Jörg, Matzen, Zietz, Kremmer, Nappi, Schwemmle, Hohenadl, Barillari, Tschachler, Monini, Ensoli, and Stürzl: (2001) EMBO J 20(20): 5568-77. .
- 15 Guenzi E, Töpol K, Lubeseder-Martellato C, Jörg A, Naschberger E, Benelli R, Albini A, Stürzl M: (2003) The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. EMBO J. 22(15):3772-82
Harlow und Lane, "Antibodies, a laboratory manual", CSH Press 1988, Cold Spring
- 20 Harbor
Töpol, Guenzi, Lubeseder-Martellato, Jörg, Naschberger, Stürzl: Proceedings of the 22nd Meeting of the European Society of Microcirculation (2002)..
Lubeseder-Martellato, Guenzi, Jörg, Töpol, Naschberger, Kremmer, Zietz, Tschachler, Hutzler, Schwemmle, Matzen, Grimm, Ensoli and Stürzl: Am J Pathol
- 25 161(5): 1749-59 (2002).
Prakash, Praefcke, Renault, Wittinghofer and Herrmann: Nature 403(6769): 567-71 (2000).

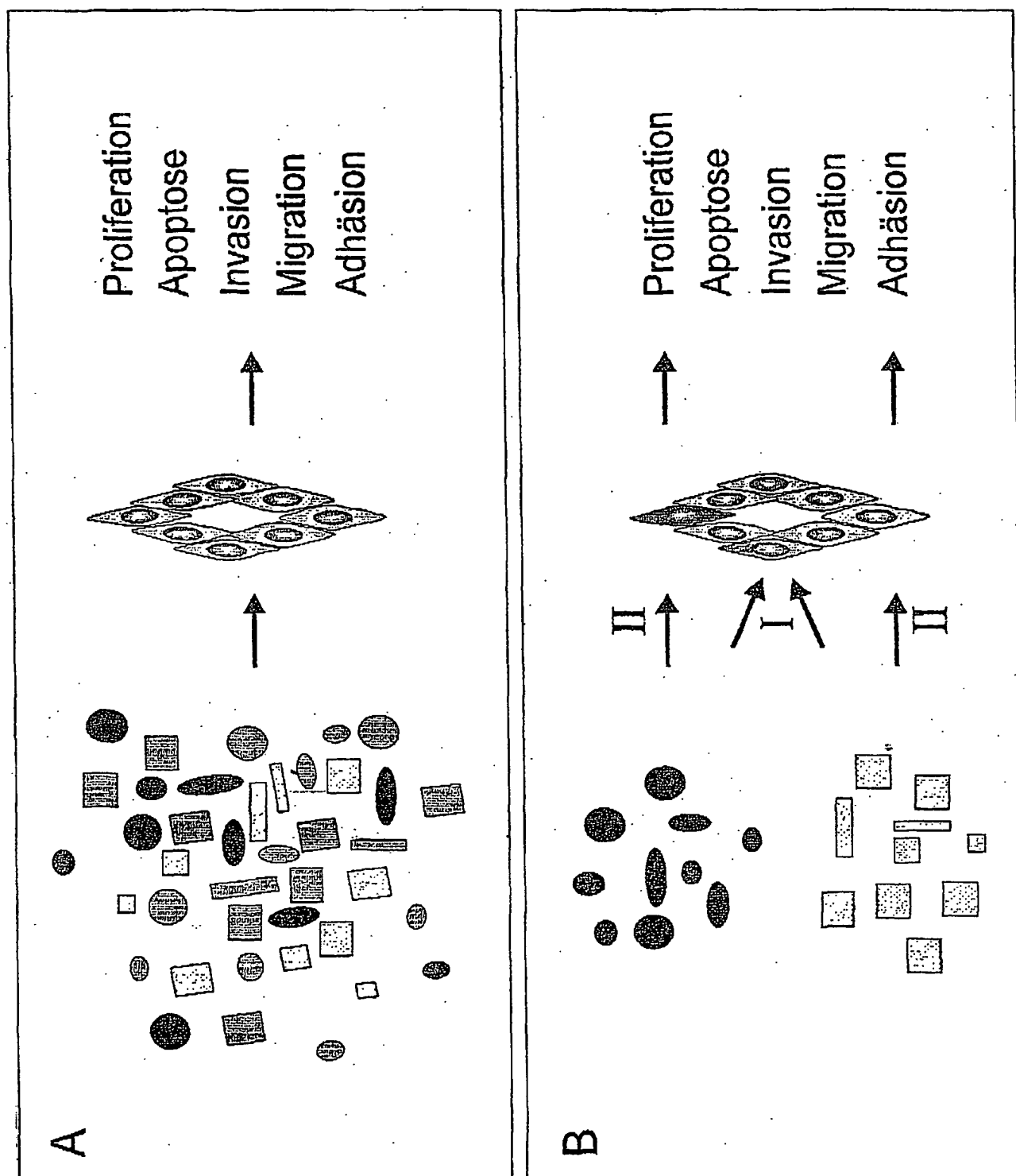
Ansprüche

1. In vitro Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
 - (c) In Kontakt bringen der Probe mit einem ersten Rezeptor, der GBP-1 oder ein Fragmente dieses Proteins spezifisch bindet; und
 - (d) Nachweis einer spezifischen Bindung des Rezeptors mit GBP-1 oder einem Fragment dieses Proteins.
2. Verfahren nach Anspruch 1, darüber hinaus umfassend den Schritt (a') oder (a'') vor dem in Kontakt mit dem ersten Rezeptor:
 - (a') Markieren der in der Probe enthaltenen Proteine; oder
 - (a'') Markieren des ersten Rezeptors.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rezeptor vor dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rezeptor nach dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das Material der Oberfläche ausgewählt ist aus einer Gruppe bestehend aus Sepharose, Latex, Glass, Polystyrol, Polyvinyl, Nitrocellulose und Silicium.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die Oberfläche eine Membran, ein Kügelchen, ein Chip oder eine Platte ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, darüber hinaus umfassend den Schritt (a'') vor dem Schritt des Nachweises einer spezifischen Bindung:
(a'') präzipitieren der Kügelchen mit den daran gebundenen Komplexen aus erstem Rezeptor und GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Nachweis der spezifischen Bindung in Schritt (b) eine gelelektrophoretische Auftrennung, optional darüber hinaus eine Western-Blot-Analyse umfasst.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins an den ersten Rezeptor in Schritt (a) die Probe mit einem zweiten Rezeptor für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins in Kontakt gebracht wird, der an ein Epitop von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins bindet, das nach Bindung des ersten Rezeptors an GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins zugänglich ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der zweite Rezeptor für GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins markiert ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Markierung des zweiten Rezeptors für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins ein signalgebendes System umfasst oder durch einen weiteren, dritten Rezeptor, der ein signalgebendes System umfasst, spezifisch erkannt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das signalgebende System ein Enzym umfasst, das dieses Signal abgibt.

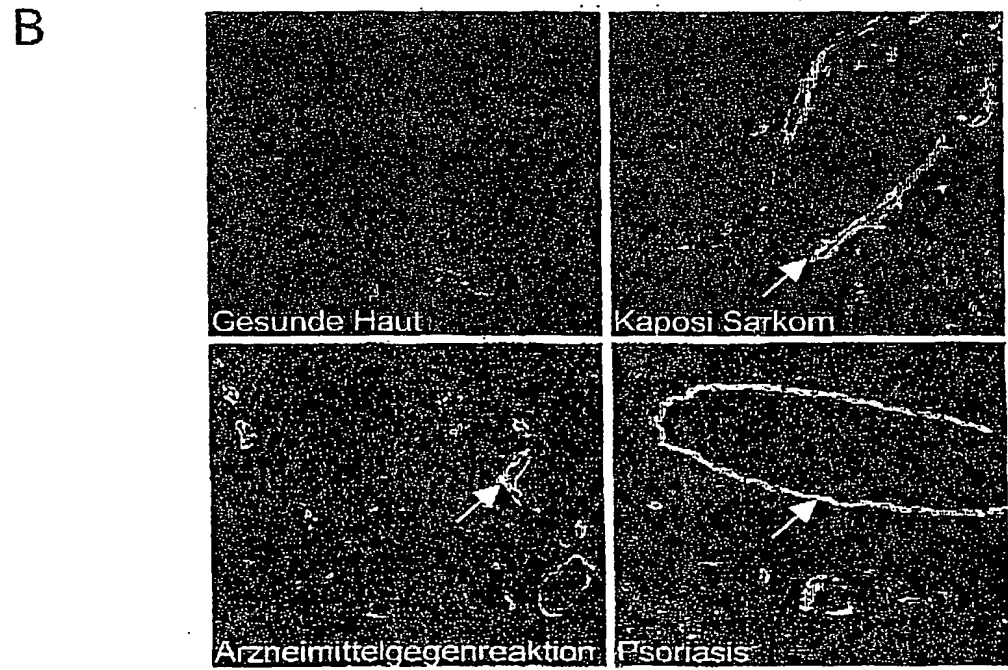
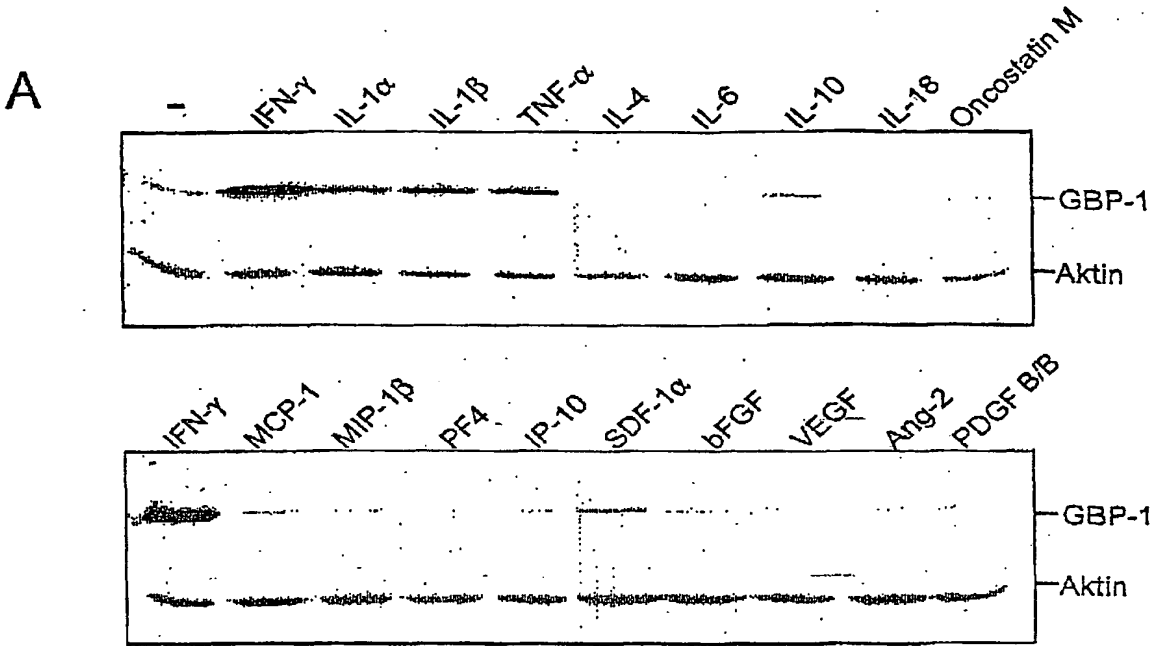
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei der erste und der zweite Rezeptor und, optional, auch der dritte Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Polypeptiden, niedermolekulare Substanzen, Antikörpern oder Fragmenten oder Derivaten davon und Aptameren.
5
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Verfahren ein ELISA, EIA, oder RIA ist.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Verfahren automatisiert ausgeführt wird.

1/9



Figur 1

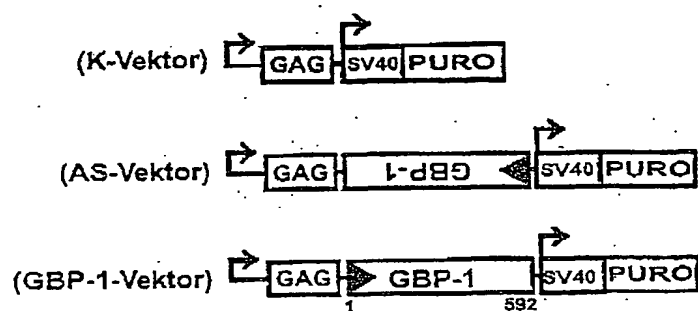
2/9



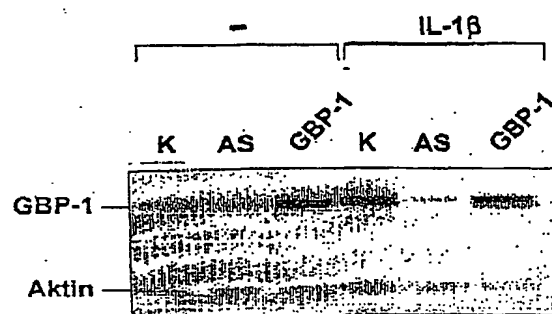
Figur 2

3/9

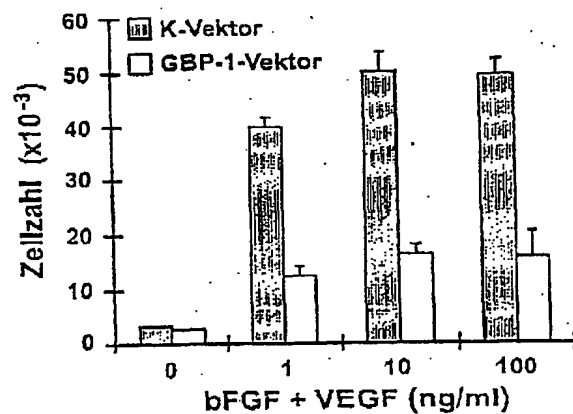
A



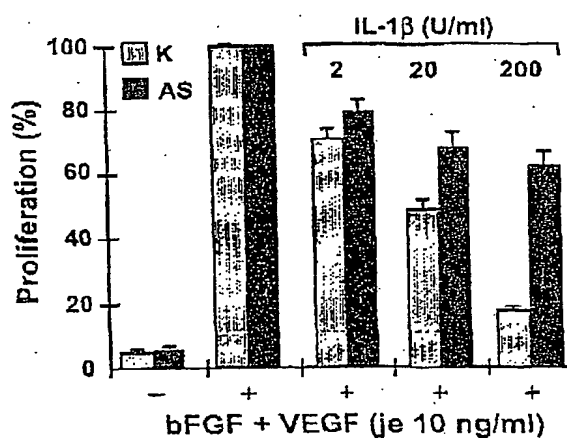
B



C



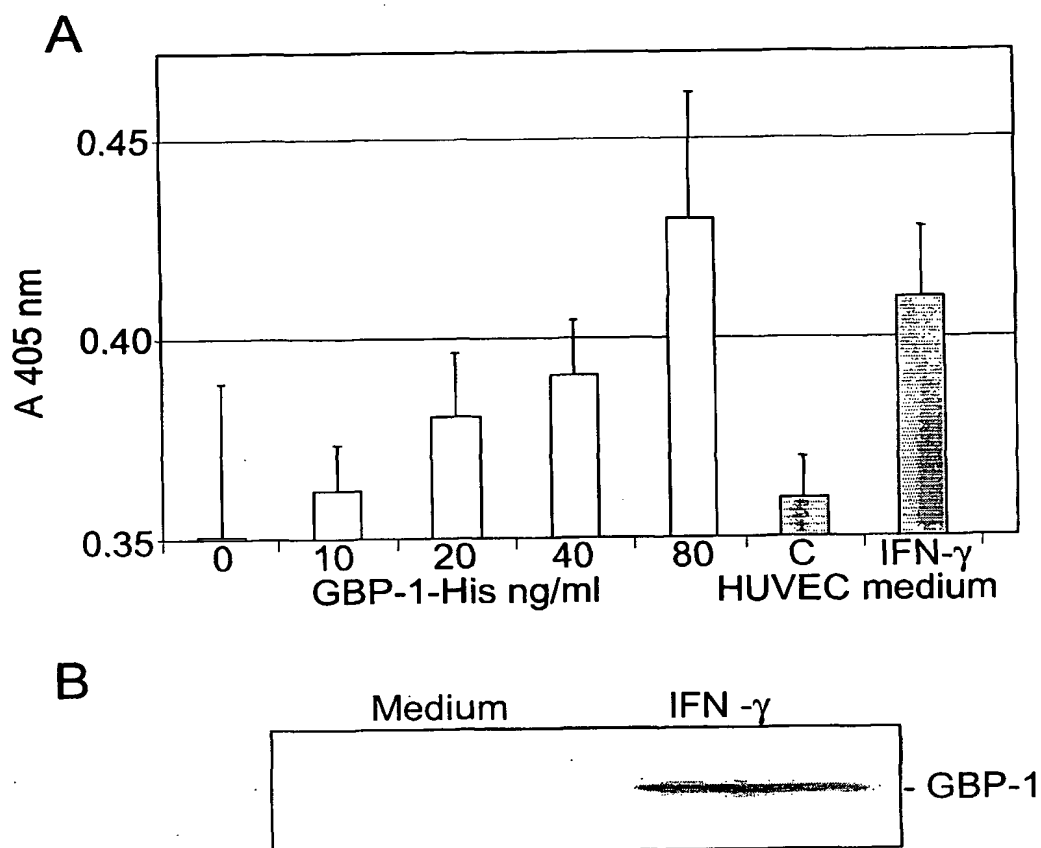
D



Figur 3

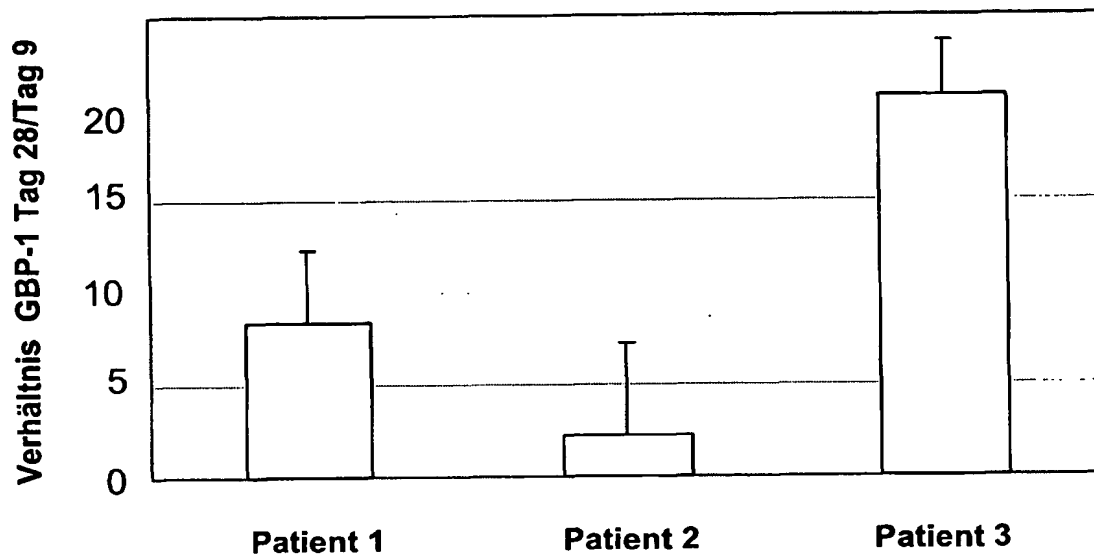
4/9

Nachweis von sezerniertem GBP-1 mittels ELISA

**Figur 4**

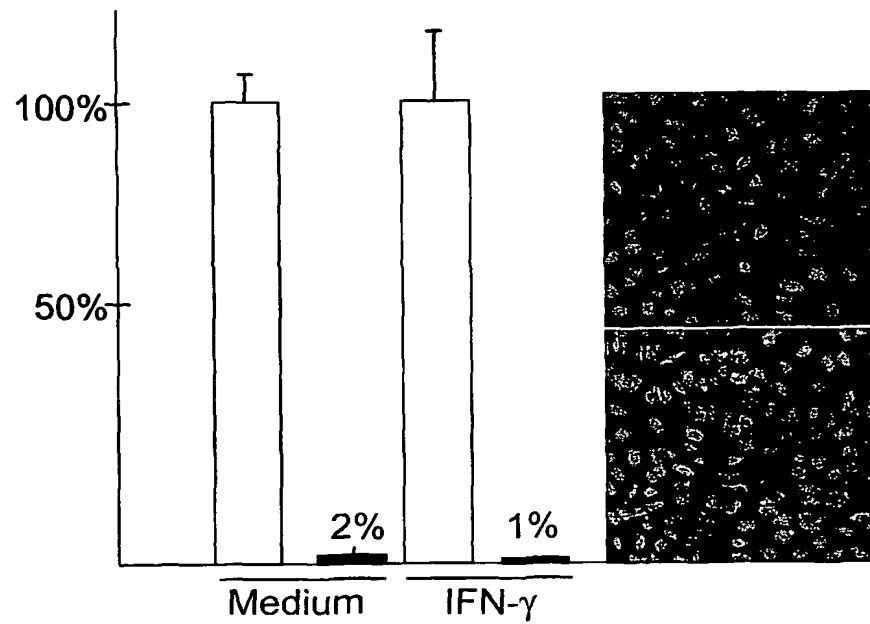
5/9

Nachweis von zirkulierendem GBP-1 im Plasma IFN- α -behandelter Patienten

**Figur 5**

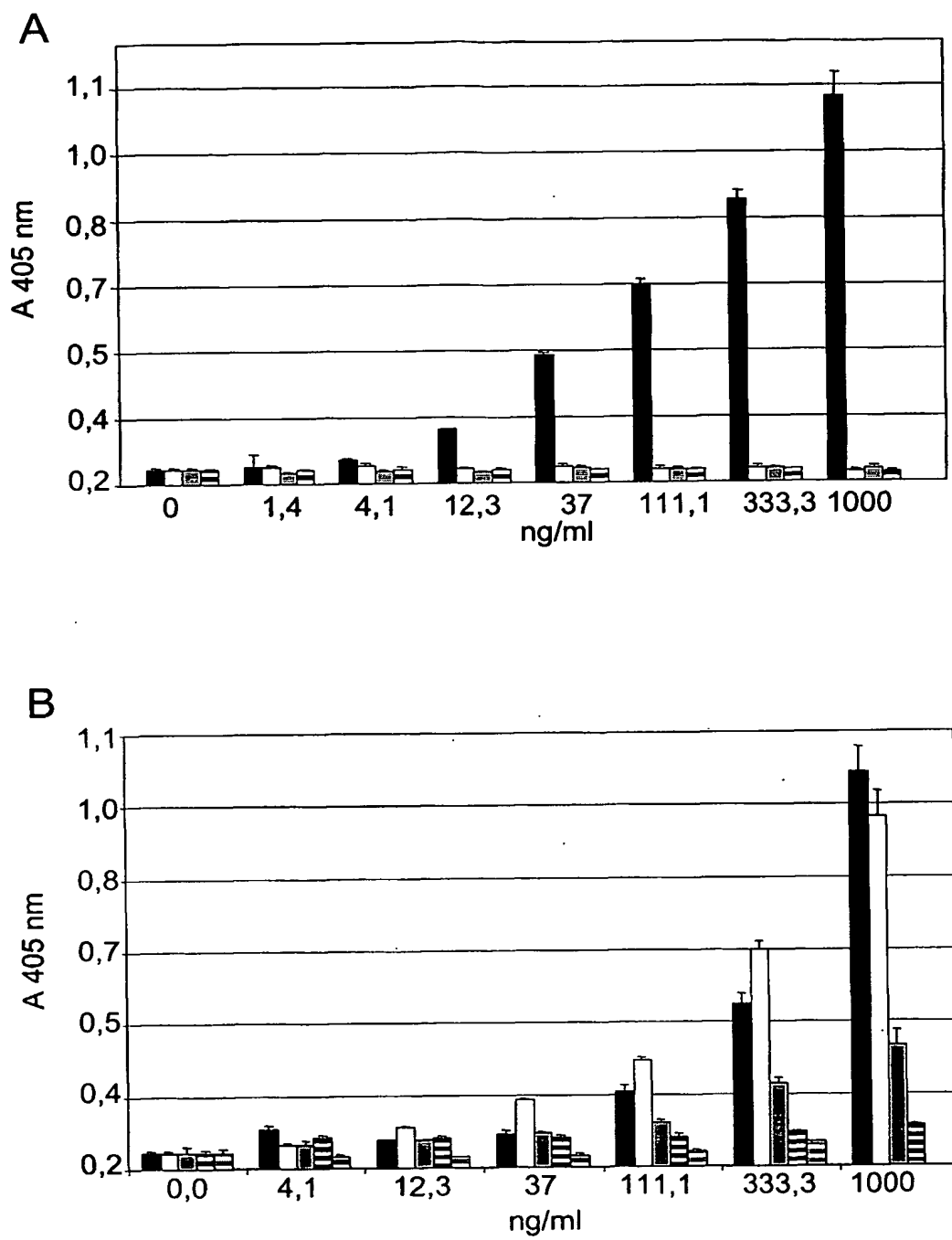
6/9

**Sekretion von GBP-1 aus INF- γ -behandelten HUVEC
beruht nicht auf einer Zunahme von Apoptose
und/oder Zellpermeabilität**



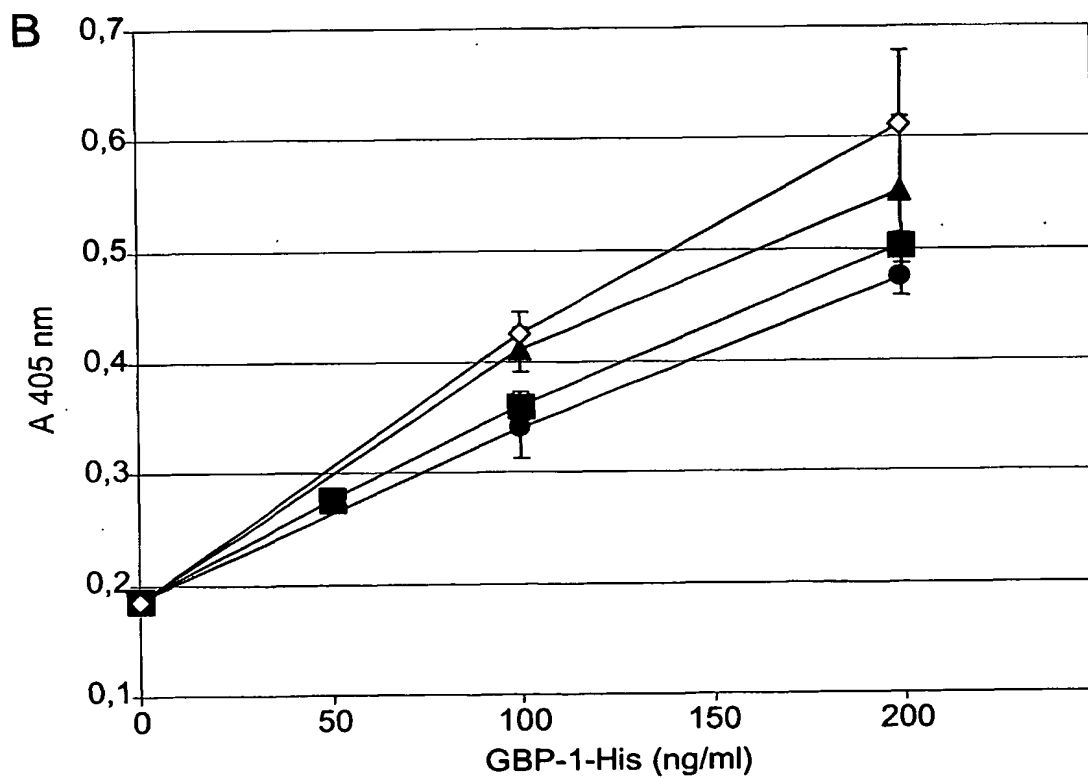
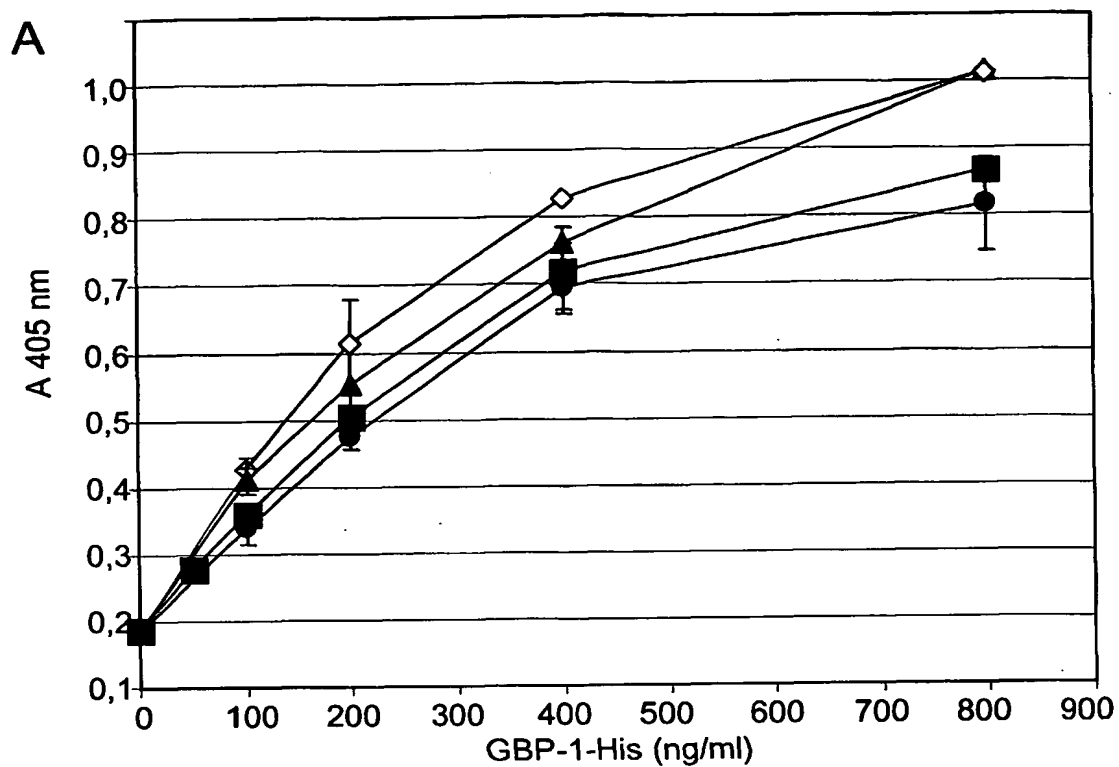
Figur 6

7/9

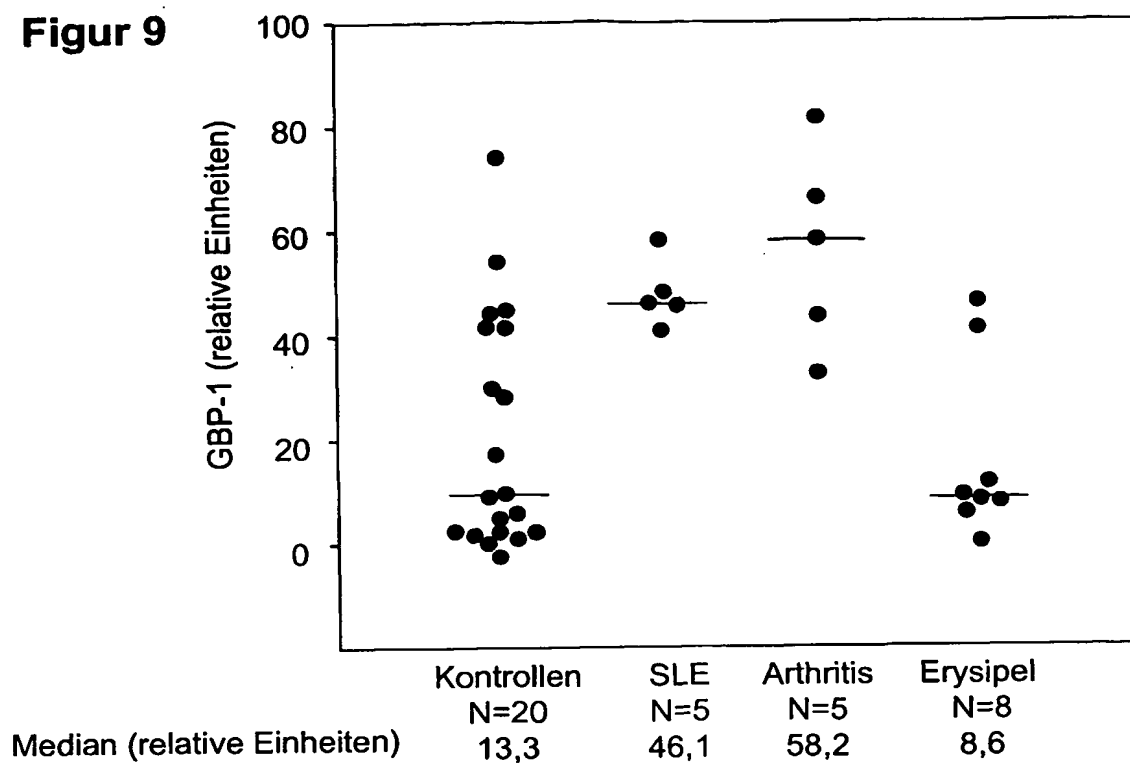
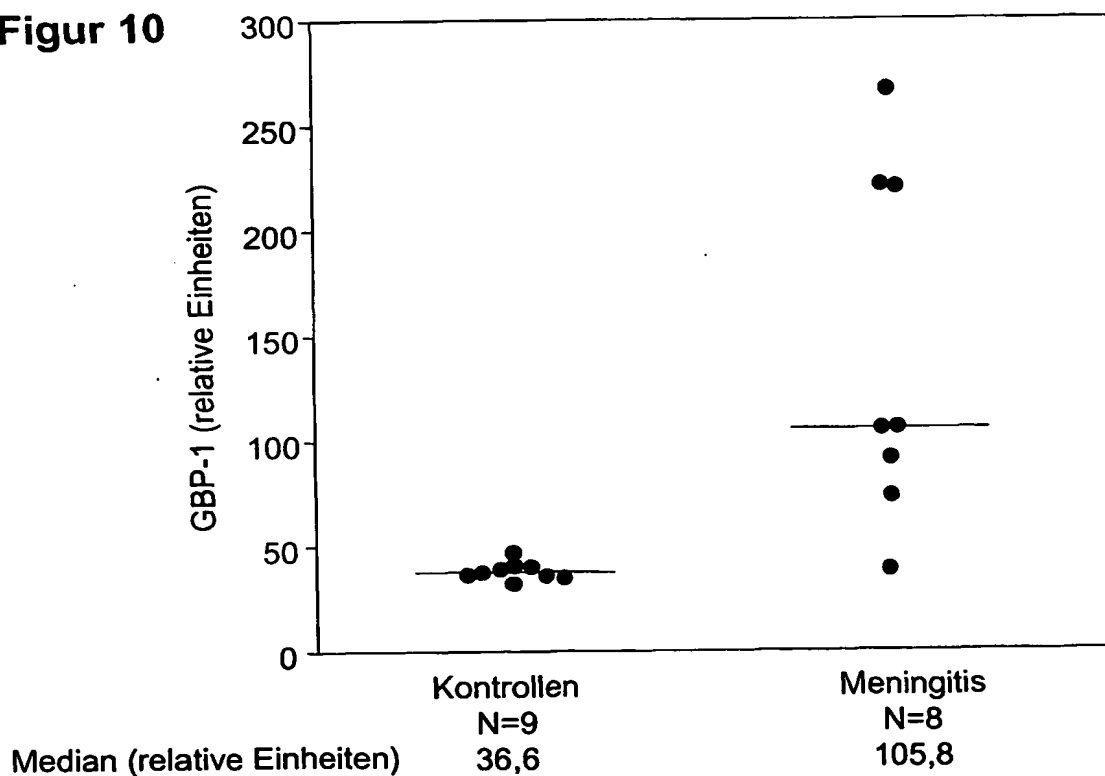


Figur 7

8/9

**Figur 8**

9/9

Figur 9**Figur 10**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/14678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUBESADER-MARTELLATO CLARA ET AL: "Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 161, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 1749-1759, XP009029105 ISSN: 0002-9440 page 1752, column 1, paragraph 2 page 1751, column 1, paragraph 3 ----	1
X	US 2002/115138 A1 (STURZL MICHAEL ET AL) 22 August 2002 (2002-08-22) page 7, column 2, paragraph 2 page 12, column 1, paragraph 2 ----- -/--	1, 4, 5, 8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2004

Date of mailing of the international search report

07/05/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bigot-Maucher, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14678

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GUENZI E ET AL: "The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines"</p> <p>EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 20, 15 October 2001 (2001-10-15), pages 5568-5577, XP002966002</p> <p>ISSN: 0261-4189</p> <p>page 5576, column 1, paragraph 1</p> <p>page 5575, column 2, paragraph 6</p> <p>---</p>	1
X	<p>YIH SHYUN E ET AL: "Interferon induction of fibroblast proteins with Guanylate binding activity"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 258, no. 12, 23 June 1983 (1983-06-23), pages 7746-7750, XP002128621</p> <p>page 7746, column 2, paragraph 3 -page 7747, column 1, paragraph 2</p> <p>page 7747, column 2, paragraph 3</p> <p>---</p>	1-3,6-8
A	<p>STREHLOW INGA ET AL: "The interferon-inducible GBP1 gene: Structure and mapping to human chromosome 1"</p> <p>GENE (AMSTERDAM), vol. 144, no. 2, 1994, pages 295-299, XP001180829</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>page 295, column 2, paragraph 2</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/14678

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Owing to the unclear phrase "or of fragments of said protein" in claims 1, 4, 7, 9, 10 and 11, the current claims 1-15 relate to an inordinately large number of possible methods, of which only a small proportion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, namely the methods that contain the protein itself.

Owing to the very broad claim 13, the current claims 1-15 relate to an inordinately large number of possible methods, of which only a small proportion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claim that appear to be supported and disclosed in the above sense, namely the examples in which the methods are carried out with antibodies.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14678

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2002115138	A1	22-08-2002	AU	5518499 A	21-03-2000
			CA	2340596 A1	09-03-2000
			WO	0012737 A1	09-03-2000
			EP	1108046 A1	20-06-2001
			JP	2002523104 T	30-07-2002
<hr/>					

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14678

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 G01N33/573

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LUBESEDER-MARTELLATO CLARA ET AL: "Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 161, Nr. 5, November 2002 (2002-11), Seiten 1749-1759, XP009029105 ISSN: 0002-9440 Seite 1752, Spalte 1, Absatz 2 Seite 1751, Spalte 1, Absatz 3 ----	1
X	US 2002/115138 A1 (STURZL MICHAEL ET AL) 22. August 2002 (2002-08-22) Seite 7, Spalte 2, Absatz 2 Seite 12, Spalte 1, Absatz 2 ----- -/-	1,4,5, 8-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. April 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bigot-Maucher, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GUENZI E ET AL: "The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines"</p> <p>EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 20, Nr. 20, 15. Oktober 2001 (2001-10-15), Seiten 5568-5577, XP002966002 ISSN: 0261-4189 Seite 5576, Spalte 1, Absatz 1 Seite 5575, Spalte 2, Absatz 6</p> <p>---</p>	1
X	<p>YIH SHYUN E ET AL: "Interferon induction of fibroblast proteins with Guanylate binding activity"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 258, Nr. 12, 23. Juni 1983 (1983-06-23), Seiten 7746-7750, XP002128621 Seite 7746, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 7747, Spalte 1, Absatz 2 Seite 7747, Spalte 2, Absatz 3</p> <p>---</p>	1-3,6-8
A	<p>STREHLOW INGA ET AL: "The interferon-inducible GBP1 gene: Structure and mapping to human chromosome 1"</p> <p>GENE (AMSTERDAM), Bd. 144, Nr. 2, 1994, Seiten 295-299, XP001180829 ISSN: 0378-1119 Seite 295, Spalte 2, Absatz 2</p> <p>-----</p>	1-15

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-15 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verfahren durch den unklaren Begriff "oder von Fragmenten dieses Proteins" in Anspruch 1, 4, 7, 9, 10, 11, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Verfahren betreffend, welche das Protein selbst beinhalten.

Die geltenden Patentansprüche 1-15 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verfahren aufgrund des sehr breiten Anspruchs 13, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Beispiele betreffend, worin die Verfahren mit Antikörpern durchgeführt werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14678

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002115138 A1	22-08-2002	AU 5518499 A	21-03-2000
		CA 2340596 A1	09-03-2000
		WO 0012737 A1	09-03-2000
		EP 1108046 A1	20-06-2001
		JP 2002523104 T	30-07-2002
<hr/>			